

文章编号:1006-3080(2010)01-0042-06

过量表达 XBP1 对于重组 CHO 细胞中 HBsAg 分泌的影响

赵建兵, 易小萍, 张元兴, 孙祥明

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要:考察了过量表达 CHO 细胞的内源性 XBP1(X-box binding protein 1)对于重组 CHO 细胞中乙肝表面抗原(HBsAg)分泌的影响。结果表明:XBP1 无法改善 DMSO 作用下 CHO 细胞中 HBsAg 的分泌,但能促进 DTT 作用下的 HBsAg 的分泌。进一步研究发现,细胞在 DTT 作用下形成了内质网分泌压力,而在 DMSO 作用下,没有形成内质网分泌压力。由此推断在内质网成为分泌限制部位的情况下,XBP1 能够促进 HBsAg 的分泌;而 DMSO 通过促进二硫键的形成促进了 HBsAg 在内质网中的分泌,使得分泌限制部位发生在分泌过程中的其他细胞器。

关键词:XBP1; HBsAg; CHO 细胞; 内质网压力; 二硫键

中图分类号:TQ920

文献标志码:A

Effects of XBP1 Overexpression on HBsAg Secretion in Recombinant CHO Cells

ZHAO Jian-bing, YI Xiao-ping, ZHANG Yuan-xing, SUN Xiang-ming

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: The effects of endogenous XBP1 (X-box binding protein 1) overexpression on HBsAg secretion in CHO cells were first tested. However, no improvement was observed with DMSO. But HBsAg secretion was significantly enhanced with DTT, an inducer of ER stress response. Further analysis showed that DMSO did not trigger the ER stress response. The function of XBP1 in facilitating protein secretion depended on whether the protein expression resulted in secretory saturation in ER. On the contrary, the presence of DMSO was able to improve HBsAg folding and facilitate it passing through ER, and caused secretory saturation in other organelle of secretory pathway.

Key words: XBP1; HBsAg; CHO cells; ER stress; disulfide bond

X-box 结合蛋白 1(X-box Binding Protein 1, XBP1)是一个碱性亮氨酸拉链蛋白,属于 CREB/ATF 转录因子家族中的一员^[1]。XBP1 调控蛋白的折叠和分泌,是未折叠蛋白反应(Unfolded Protein Response, UPR)的一个重要组分^[2]。当大量未折叠或错误折叠的蛋白质堆积于内质网内,形成严重

压力时,细胞上调 XBP1 mRNA 的转录,并迅速剪接,翻译成大量有活性 XBP1(s)蛋白。XBP1(s)是作用于 UPR 或内质网压力反应(ER stress response)的元件,上调一系列与蛋白折叠、分泌相关的基因,如二硫键异构酶、分子伴侣 GRP78(Glucose Regulated Protein 78)、GRP94(Glucose Regu-

收稿日期:2009-03-30

作者简介:赵建兵(1982-),男,浙江人,硕士生,研究方向:动物细胞制药。E-mail:zhaojianbing2002@163.com

通讯联系人:易小萍,E-mail:xpyi@ecust.edu.cn

lated Protein 94)等,增大内质网和细胞的体积与表面积,提高细胞处理蛋白的能力^[3-4]。

近来不少研究认为哺乳动物细胞分泌能力的不足限制了重组蛋白产量的提高,因此尝试将与蛋白分泌相关的基因引入细胞,促进重组蛋白的分泌。XBP1 被证实能够促进哺乳动物细胞中部分重组蛋白的分泌。Marcel 等^[5]将人 XBP1 基因转染入 CHO 细胞中,3 个重组蛋白(SEAP:胎盘碱性磷酸酶,SAMY:嗜热脂肪芽孢杆菌来源的 α 淀粉酶,VEGF121:血管内皮生长因子 121)分泌量分别提高了 3~5 倍不等,但在 HEK293、HeLa 和 HT-1080 细胞中,XBP1 没有表现出对上述蛋白分泌起促进作用。Eric 等^[6]发现 CHO 细胞中过量表达外源 XBP1 促进了单克隆抗体的分泌,但也指出了 XBP1 的作用具有蛋白和细胞株的特异性。Sebastian 等^[7]认为当细胞的分泌途径处于饱和时,XBP1 是提高蛋白产量的有效策略。

乙肝表面抗原(HBsAg)是一个典型的重组病毒外膜蛋白和重要的预防乙型肝炎的疫苗,但 CHO 细胞培养生产 HBsAg 的产率及分泌效率较低。本实验室在前期工作中应用 DMSO 改善了 HBsAg 的产率,然而同时发现,DMSO 作用下胞内 HBsAg 的分泌达到了饱和^[8],分泌成为 HBsAg 表达量提高的限制步骤。本文考察了过量表达内源性 XBP1 对于重组 CHO 细胞中 HBsAg 分泌的影响,并分析了产生不同效果的原因。

1 材料和方法

1.1 细胞和细胞培养

表达 HBsAg 的重组 CHO 细胞株来源于武汉生物制品所。培养基为补加了 $\varphi=0.1$ 的新生牛血清和 1 mmol/L MTX 的 DMEM 培养基,培养条件为 37 °C, $\varphi=0.05$ 的 CO₂ 培养箱中培养。

1.2 重组质粒构建

Trizol 法抽提 CHO 细胞总 RNA,逆转录成 cDNA。以 P1 (5'-TTTAAGCTTATTATGGTG-GTGGTGGCAGCG-3') 和 P2 (5'-GGCTCTAGATTAGACACTAATCAGCTG-3') 为引物(上海英骏生物技术有限公司),PCR 扩增 XBP1(s)。PCR 产物插入 pcDNA3.1 载体的 *Xba*I 和 *Hind*III 间,得重组质粒 pcDNA3.1-XBP1。

1.3 细胞转染及筛选

接种 5.0×10^5 cells 重组 CHO 细胞于 6 孔板中,24 h 后,取 2 μ g pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-XBP1

质粒分别稀释于 50 μ L 不含血清和抗生素的 DMEM 中,分别与含梭华-SofastTM 的 DMEM 混合,室温孵育 20 min 后加入到 6 孔板中。用 1 000 μ g/mL 的 G418 进行筛选,稀释分离得单克隆。

1.4 分析

HBsAg 的相对浓度测定采用 HBsAg 酶联免疫(ELISA)体外诊断试剂盒(上海华美生物工程公司)。胞内蛋白二硫键含量采用 DTNB 法测定^[9]。利用 RT-PCR 分析 XBP1 和 BiP(heavy-chain binding protein) mRNA 的含量,并以 GAPDH 看家基因进行标定。分析 BiP mRNA 含量的引物为:P3 (5'-ATGAAGTTCCTATGGTGGCG-3') 和 P4 (5'-CTTGCTTGATGCTGAGAAGACAGG-3')。采用 Real-time PCR 中的比较 Ct 法相对定量 XBP1^[10],其引物为:P5 (5'-CTGACTACTGAGAGGCTCCAGAGAC-3') 和 P6 (5'-GGTCCAACTTGTC-CAGAATGCC-3')。

2 结果与讨论

2.1 pcDNA3.1-XBP1 重组质粒的构建

根据 NCBI 上公布的家鼠、挪威鼠和人的 XBP1 (s)的基因序列(彼此同源性达 85%以上),设计了引物 P1 和 P2。以逆转录得到的 cDNA 作为模板 PCR 扩增,得到 1 100 bp 左右的目的片段(图 1)。测序后确定 CHO 细胞中的 XBP1 (s) 大小为 1 113 bp,与家鼠、挪威鼠 XBP1 (s) 基因序列相比同源性为 92%。将目的片段插入载体 pcDNA3.1 的 *Xba*I 和 *Hind*III 之间,测序验证完全正确,即得表达载体 pcDNA3.1-XBP1。

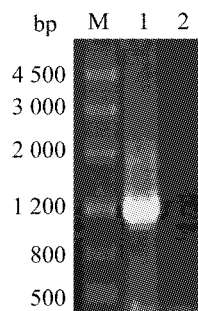


图 1 PCR 扩增 XBP1(s) 基因

Fig. 1 PCR amplification of XBP1(s) gene
M—DNA marker; 1—XBP1(s) gene; 2—Blank

2.2 内源性 XBP1 在 CHO 细胞中过量表达

对 pcDNA3.1-XBP1 转染表达 HBsAg 的重组 CHO 细胞进行定量检测。选用看家基因 GAPDH,

采用 RT-PCR 进行相对定量检测,以转染有空载体 pcDNA3.1 和未进行转染的 CHO 细胞进行对照,挑选出 7 株克隆。结果显示,7 株克隆的 XBP1 表达量明显高于对照(图 2)。进一步采用 Real-time PCR 中的比较 Ct 法相对定量 XBP1。结果显示,与对照相比,7 株克隆中 XBP1 的含量分别提高了 2~9 倍不等(图 3)。

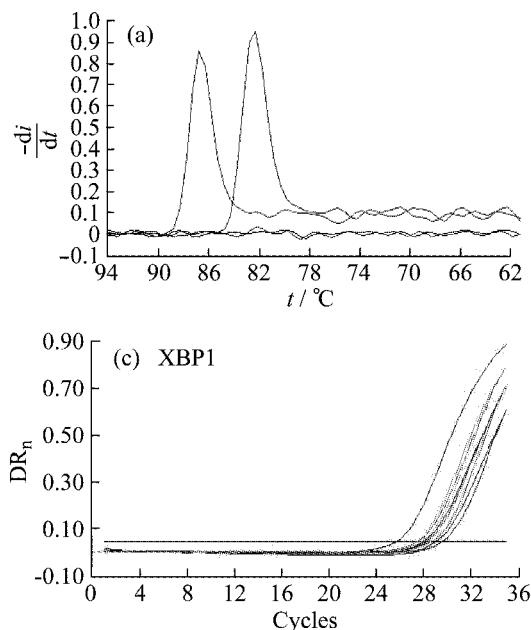


图 3 Real-time PCR 测定 XBP1 表达

Fig. 3 Real-time PCR analysis of XBP1 expression

a—Melt curves of XBP1 and GAPDH; b—Amplification curve of GAPDH by real-time PCR; c—Amplification curve of XBP1 by real-time PCR; d—Fold change of the XBP1 mRNA

分子伴侣 ERdj4 (DNAJ homolog subfamily B member 4, DNAJB4) 是 XBP1 调控的主要基因。RT-PCR 分析表明,与对照相比,7 株克隆的 ERdj4 表达明显提高(图 4)。说明在这 7 株克隆中,XBP1 不仅过表达,而且发挥调控功能。这些克隆株的生长与对照相比没有明显的差异,XBP1 过表达对细胞生长没有明显影响(数据未列出)。

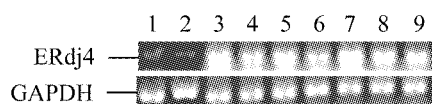


图 4 RT-PCR 测定 ERdj4 表达

Fig. 4 RT-PCR analysis of ERdj4 expression

1—Control; 2—Mock cell; 3~9—XBP1_3, 11, 16, 26, 35, 42, 51

2.3 DMSO 作用下,XBP1 对于 HBsAg 分泌的影响

CHO 细胞表达的 HBsAg 分泌效率低,容易在胞内积累,利用 DMSO 提高 HBsAg 表达时,胞内 HBsAg 积累现象尤其明显。李军辉等^[8]发现添加 $\omega=0.015$ 的 DMSO 后,HBsAg 的总量提高了 9

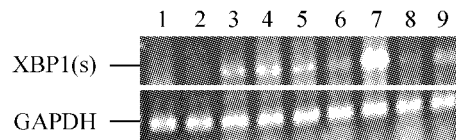
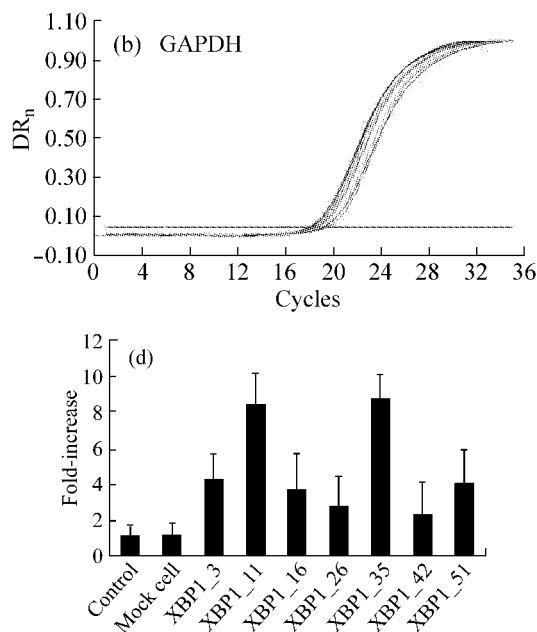


图 2 RT-PCR 测定 XBP1 表达

Fig. 2 RT-PCR analysis of XBP1 expression

1—Control; 2—Mock cell (CHO cells transfected with pcDNA3.1); 3~9—XBP1_3, 11, 16, 26, 35, 42, 51



倍,但大部分 HBsAg 积累在胞内,胞外分泌量仅提高了 80%。这说明 HBsAg 的分泌途径已处于饱和,胞内的 HBsAg 无法顺利分泌到胞外。而 XBP1 被认为是促进这种情况下蛋白分泌的有效因子。

考察 XBP1 过表达能否促进克隆株中的 HBsAg 的分泌。首先考察克隆株 35、51 与对照细胞的单位细胞胞内外 HBsAg 总表达量的情况。结果表明(图 5),在添加及不添加 DMSO 情况下,克隆株 35、51 与对照细胞的单位细胞 HBsAg 表达量基本相同。然后考察 HBsAg 的分泌情况,发现在 $\omega=0.015$ 的 DMSO 作用下,克隆株 35、51 与对照细胞的单位细胞胞外 HBsAg 分泌量也基本相同(图 6),胞外 HBsAg 的最高浓度分别为 2.4, 2.5, 2.2, 2.4 mg/L。无 DMSO 作用时,单位细胞胞外 HBsAg 分泌量同样也基本相同(图 7)。表明 XBP1 表达量的提高并没有明显地促进 HBsAg 的分泌。然而,不少研究报道了 XBP1 对重组蛋白分泌的促进作用,这些蛋白包括了干扰素、抗体、细胞因子等

等,因此下一步探讨为何 XBP1 不能促进 DMSO 作用下 HBsAg 的分泌。

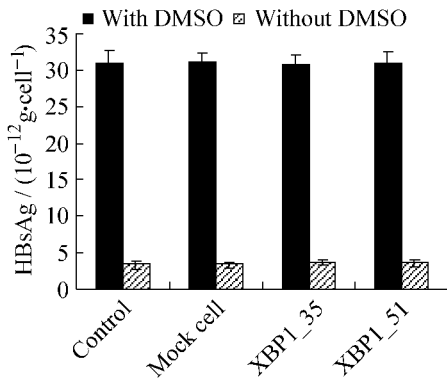


图 5 克隆细胞与对照细胞 HBsAg 表达量情况
Fig. 5 Production of HBsAg in control cell, mock cell, XBP1_35 and XBP1_51

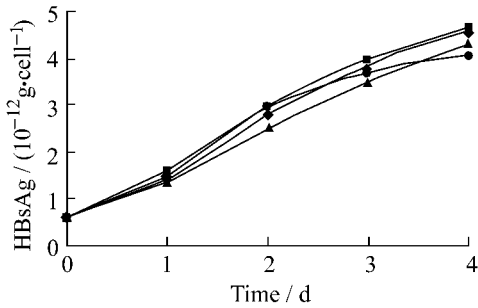


图 6 $w=0.015$ 的 DMSO 作用下,克隆细胞与对照细胞 HBsAg 分泌情况
Fig. 6 Secretion of HBsAg in XBP1_35 and XBP1_51 cells cultured with $w=0.015$ DMSO

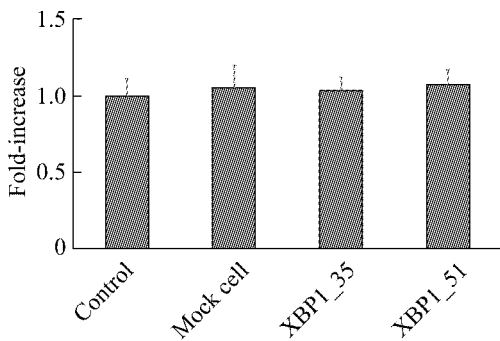


图 7 无 DMSO 作用下,克隆细胞与对照细胞的 HBsAg 分泌
Fig. 7 Secretion of HBsAg in XBP1_35 and XBP1_51 cells cultured without DMSO

2.4 XBP1 对 HBsAg 分泌的影响及作用机制

有报道表明只有当蛋白分泌受到限制的情况下,XBP1 对于蛋白分泌的促进作用才会比较明显^[7]。本文考察了 DTT 诱导形成内质网压力下,

XBP1 是否可以促进 HBsAg 的分泌。DTT 是另一种能够引起分泌限制的分子,能够破坏蛋白中二硫键的形成,使蛋白无法运送出内质网。结果显示(图 8),添加 DTT 后,24 h 时未转染 XBP1 的 CHO 细胞由于 DTT 阻碍内质网中 HBsAg 的正确折叠,HBsAg 的分泌量明显减少(0.6×10^{-12} g/cell,对照为 0.95×10^{-12} g/cell)。而两个克隆株 35、51 在 DTT 处理后分泌量没有明显下降(克隆株 35: 1.22×10^{-12} g/cell,对照为 1.18×10^{-12} g/cell;克隆株 51: 1.17×10^{-12} g/cell,对照为 1.12×10^{-12} g/cell)。由此可见,DTT 处理细胞产生内质网压力后,XBP1 的过表达确实能够促进 CHO 细胞表达 HBsAg 的分泌,XBP1 可以抵消 DTT 诱导的细胞内质网压力对蛋白分泌的负作用。由此可以推测 DMSO 与 DTT 造成细胞分泌限制的作用机制不同,DTT 的作用点是内质网,XBP1 可能只对 DTT 类似的分泌限制起作用。由于动物细胞分泌途径非常复杂,包括蛋白在内质网中修饰折叠、运送出内质网、运送至高尔基体、跨越细胞膜等等。其中的任何一步出现问题,都会引起蛋白分泌的限制。

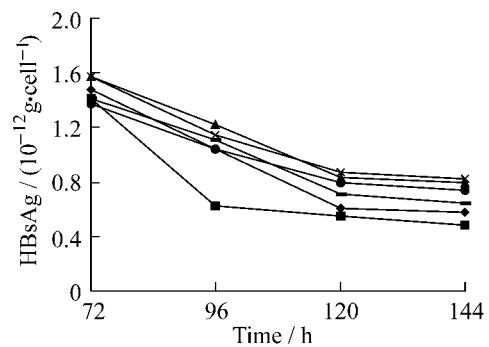


图 8 DTT 作用下,克隆细胞与对照细胞中 HBsAg 分泌情况
Fig. 8 Secretion of HBsAg in control, mock cell, XBP1_35 and XBP1_51 cultured with DTT

由此,进一步考察了 DMSO 是否同样作用于内质网,XBP1 以及内质网分子伴侣 BiP 是内质网是否存在分泌压力的标志性基因。当存在内质网压力,蛋白无法顺利分泌出内质网时,细胞内 XBP1 和 BiP 表达量会增加,因此可以根据 XBP1 和 BiP 的表达确定内质网是否成为蛋白分泌的限制部位。结果显示,DMSO 处理后,表达 HBsAg 的 CHO 细胞中 XBP1 的表达没有明显的增加,而 BiP 基因不但没有增加,反而有所减少(图 9),这表明 DMSO 并

没有造成表达 HBsAg 的 CHO 细胞中内质网分泌的限制。Morihiko 等^[10]报道 2 mg/mL DMSO 作用下,细胞没有发生明显的内质网压力。因此可以推断在表达 HBsAg 的 CHO 细胞中,DMSO 与 DTT 造成细胞分泌限制的机制是不同的,DMSO 的作用点不是内质网。由此推断 XBP1 的作用可能仅限于内质网,而 DMSO 也许造成了细胞分泌途径中其他部位分泌的限制。

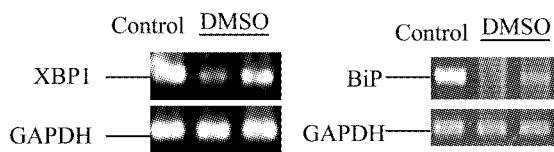


图 9 RT-PCR 分析 DMSO 作用下重组 CHO 细胞中 XBP1 和 BiP 的变化

Fig. 9 RT-PCR analysis of XBP1 and BiP in rCHO cells with and without DMSO

为了进一步了解 DMSO 的作用机制,利用 DTNB 法(由还原剂打开蛋白中二硫键而测得的蛋白总巯基数,减去蛋白中自由的巯基数,即得到蛋白中形成二硫键的巯基数,从而测得蛋白中二硫键的相对含量)测定总蛋白中二硫键含量的变化,考察 DMSO 对蛋白的二硫键、折叠的影响。结果显示(图 10),没有 DMSO 存在时,单位胞内蛋白的二硫键含量为 $1.7 \mu\text{g}/\text{mg}$;DMSO 存在下,单位胞内蛋白中的二硫键含量增加近一倍,为 $3.2 \mu\text{g}/\text{mg}$,表明 DMSO 可以通过减少自由巯基,促进细胞中蛋白二硫键的形成,从而提高内质网对于蛋白的折叠加工能力。相关文献也报道了 DMSO 能够促进二硫键的形成^[11]。

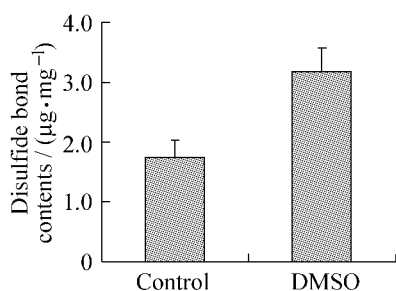


图 10 DMSO 作用下,CHO 细胞总蛋白中二硫键含量

Fig. 10 Disulfide bond contents of the total intracellular protein in CHO cells cultured with DMSO

由此推断 DMSO 促进了内质网中 HBsAg 二硫键的形成,使得大量进入内质网的 HBsAg 能够正确折叠,顺利离开内质网,没有造成内质网分泌限制,这正是 XBP1 能够促进 DTT 作用下 HBsAg 的

分泌而不能促进 DMSO 处理下的 HBsAg 分泌的原因。

近年来,针对哺乳动物细胞表达的重组蛋白分泌效率较低的问题,不少研究者提出,利用代谢工程的方法,将与蛋白分泌相关的基因引入细胞,促进重组蛋白分泌(即分泌工程)^[5]。其中 XBP1 作为调控蛋白折叠、修饰的转录因子,成为分泌工程中重要的着眼点。XBP1 能够诱导一系列与分泌相关的基因的表达,扩大内质网的表面积,在蛋白分泌的过程中起着非常重要的作用。在一些重组蛋白表达中,确实观察到 XBP1 的促进分泌作用。但是 XBP1 促进重组蛋白分泌的机制仍有待进一步研究。对于不同性质的蛋白以及不同分泌限制类型,XBP1 也表现出不同的作用。对于那些没有正确折叠和修饰,内质网分泌能力饱和的蛋白,XBP1 的作用比较明显。而对于分泌限制步骤不在内质网的蛋白,如本文 DMSO 处理的 HBsAg,XBP1 并无明显作用。由此可推断,XBP1 是否有促进重组蛋白的分泌作用,关键在于该蛋白的表达过程中,内质网的分泌能力是否达到饱和。

3 结 论

本文首先获得了 CHO 细胞内源性 XBP1(s) 基因,发现 XBP1 过量表达不能促进 DMSO 作用下的 HBsAg 分泌,但可以促进 DTT 处理的 HBsAg 分泌;通过分析细胞内质网分泌压力的指标性基因 XBP1 和 BiP,发现 DMSO 没有导致内质网分泌压力,而 DTT 可明显产生内质网分泌压力,说明在内质网成为分泌限制部位的情况下,XBP1 能够促进 HBsAg 的分泌;DMSO 能够提高蛋白中二硫键的含量,使得 HBsAg 能够在内质网中顺利折叠,未造成内质网分泌能力的饱和,使得分泌限制部位发生在分泌过程中的其他细胞器。

参考文献:

- [1] Liou H C, Boothby M R, Finn P W, *et al.* A new member of the leucine zipper class of proteins that binds to the HLA DR alpha promoter[J]. *Science*, 1990, **247**(4950): 1581-1584.
- [2] Sargysan E, Baryshev M, Mkrtrchlan S. The physiological unfolded protein response in the thyroid epithelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **322**(2): 570-576.
- [3] Fang Yan, Yan Jinghua, Ding Lihua, *et al.* XBP-1 increases Eralpha transcriptional activity through regulation of large-scale chromatin unfolding[J]. *Biochem Biophys Res Com-*

- mun, 2004, **323**(1): 269-274.
- [4] Sriburi R, Jackowski S, Mori K, *et al.* XBP1: A link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum[J]. *J Cell Biol*, 2004, **167**(1): 35-41.
- [5] Marcel T, Martin F. Xbp1-based engineering of secretory capacity enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells[J]. *Metab Eng*, 2006, **8**: 264-272.
- [6] Eric B, Lore F, Klaus P, *et al.* A XBP-1 dependent bottleneck in production of IgG subtype antibodies in chemically defined serum-free Chinese hamster ovary (CHO) fed-batch processes[J]. *J Biotechnol*, 2008, **135**(2): 217-223.
- [7] Sebastian C, Daphne T, Miranda G, *et al.* Effects of overexpression of X-box binding protein1 on recombinant protein production in Chinese hamster ovary and NS0 myeloma cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, **99**(1): 155-164.
- [8] Li Junhui, Sun Xiangming, Zhang Yuanxing. Improvement of hepatitis B surface antigen expression by dimethyl sulfoxide in the culture of recombinant Chinese hamster ovary cells [J]. *Process Biochem*, 2006, **41**: 317-322.
- [9] Akiko S I, Hiroshi M, Hiroshi S. Effect of disulfide-bond introduction on the activity and stability of the extended-spectrum class A β -lactamase Toho-1 [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, **1764**: 1349-1355.
- [10] Hirota M, Kitagaki M, Itagaki H, *et al.* Quantitative measurement of spliced XBP1 mRNA as an indicator of endoplasmic reticulum stress[J]. *J Toxicol Sci*, 2006, **31**(2): 149-156.
- [11] Tam J P, Wu Cuirong, Liu Wen. Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide[J]. *J Am Chem Soc*, 1991, **113**: 6657-6665.